

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Roman Sõtšov

**Metüültransferaas Set2 roll transkriptsiooni elongatsioonil pagaripärmis  
*Saccharomyces cerevisiae***

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Arnold Kristjuhan, *PhD*  
Henel Sein, *MSc*

TARTU 2014

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS.....	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1. Kromatiini struktuur.....	5
1.2. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid .....	6
1.2.1. Histonide metüleerimine .....	7
1.2.2. H3K36 metüleerimine .....	8
1.3. Set2 lokalisatsioon rakus ja DNA-l.....	9
EKSPERIMENTAALNE OSA.....	12
2.1. Töö eesmärgid .....	12
2.2. Materjal ja meetodika.....	13
2.2.1 Kasutatud söötmed .....	13
2.2.2. Kasutatud pärmitüved .....	13
2.2.3. Pärm transformeerimine .....	14
2.2.4. Genoomse DNA eraldamine .....	15
2.2.5. Immunosadestamine ja Western-blot (WB) .....	15
2.2.6. Kromatiin Immunosadestamine (ChIP).....	17
2.2.7. Kvantitatiivne PCR (qPCR) .....	19
2.3 Tulemused .....	21
2.3.2 Mudelsüsteemi kirjeldus .....	21
2.3.3 Set2-e märgistamine 3x3F12 epitoobiga.....	22
2.3.4 Set2 levik VPS13 geenil.....	23
2.3.5 Set2 levik transkribeeritavas geenis .....	24
2.4 Arutelu.....	26
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY .....	29
KIRJANDUSE LOETELU .....	31
LISA 1 .....	34
Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	36

## KASUTATUD LÜHENDID

ap – aluspaar

BSA – *bovine serum albumin* (veise seerumalbumiin)

ChIP – *chromatin immunoprecipitation* (kromatiini immuunosadestamine)

CTD – *C-terminal domain* (C-terminaalne domeen)

Ctk1 – *cyclin-dependent kinase 1* (tsükliin sõltuv kinaas 1)

H2A – histoon 2A

H2B – histoon 2B

H3 – histoon 3

H4 – histoon 4

HAT – *histone acetyltransferase* (histoonide atsetüültransferaas)

HMT – *histone methyltransferase* (histoonide metüültransferaas)

HRP – *horse radish peroxidase* (mädarõika peroksüdaas)

kb – *kilobasepair* (kiloaluspaar)

N-terminaalne - amino-terminaalne

PBS – *phosphate buffered saline* (fosfaatpuhverdatud soolalahus)

PRMT- *protein arginine methyltransferase* (arginiini metüültransferaas)

PTM – post-translatsiooniline modifikatsioon

RNAPII – RNA polümeraas II

SRI - *Set2-Rpb1 interacting* (Set2 ja Rpb1 vaheline interaktsioon)

WB – *western-blot*

WCE – *whole cell extract* (rakkude tuumade ja tsütoplasma ekstrakt)

YPD – *Yeast extract, peptone, dextrose* (pärmie ekstrakt, peptoon, dekstroos, kõiki pärmie eluks vajalikke komponente sisaldav pärmisööde)

## SISSEJUHATUS

Eukarüootsete organismide pärilik informatsioon asub DNAs, mis on rakutuumas kokku pakitud kromatiiniks. Kromatiini kordusühik on nukleosoom, mis koosneb histoonidest H2A, H2B, H3 ja H4, mille ümber on keerdunud 147 aluspaari pikkune DNA ahel. Sellist struktuuri nimetatakse nukleosoomiks ja on vajalik DNA tihedamaks pakkimiseks ja mahutamiseks raku tuuma. Kromatiin aga ei ole ainult staatiline, vaid ka dünaamiline. Tema struktuuri saab muuta läbi mitmete mehhanismide, nagu histoonide kovalentsete modifitseerimiste, nukleosoomide eemaldamise või kromatiini remodeleerimise abil.

On olemas mitmeid histoonide post-translatsioonilisi modifikatsioone: ühed muudavad nukleosoomide pakituse astet, mis teeb kromatiini kas rohkem või vähem kättesaadavaks erinevatele faktorile, teised aga moodustavad seondumiskoha mittehistoonsetele valkudele. Histoonide metüleerimine on oluline post-translatsiooniline modifikatsioon, mis toimub kas lüsiini- või arginiinijäägis. Sõltuvalt metüleerimise astmest ja toimumiskohast on võimalik eristada eukromatiini ja heterokromatiini. Näiteks histoon H3 lüsiinijääk 4 di- ja trimetüleerimine (H3K4me<sub>2/3</sub>), histoon H3 lüsiinijääk 36 di- ja trimetüleerimine (H3K36me<sub>2/3</sub>) ja histoon H3 lüsiinijääk 79 trimetüleerimine (H3K36me<sub>3</sub>) on tavaliselt seotud aktiivsete geenidega, kuid histoon H3 lüsiinijääk 9 ja 27 di- ja trimetüleerimine (H3K9me<sub>2/3</sub>, H3K27me<sub>2/3</sub>) ning histoon H4 lüsiinijääk 20 trimetüleerimine (H4K20me<sub>3</sub>) on seotud vaigistatud geenidega. Keeruliste histoonide modifikatsioonimusterite tagajärg on senini täielikult mõistmata. Kuna palju sõltub histoonide metüleerimise asukohast, peavad histoonide metüültransferaasid olema kõrge spetsiifilisusega, ent kuidas need kromatiini modifitseerivad ensüümid spetsiifilistele lookustele kaasatakse on suuresti teadmata.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist, histoonide metüleerimisest ja metüültransferaas Set2 funktsioonist ja positsioneerumisest rakus. Eksperimentaalses osas uuritakse pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) Set2 lokalisatsiooni transkribeeritavas geenis.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

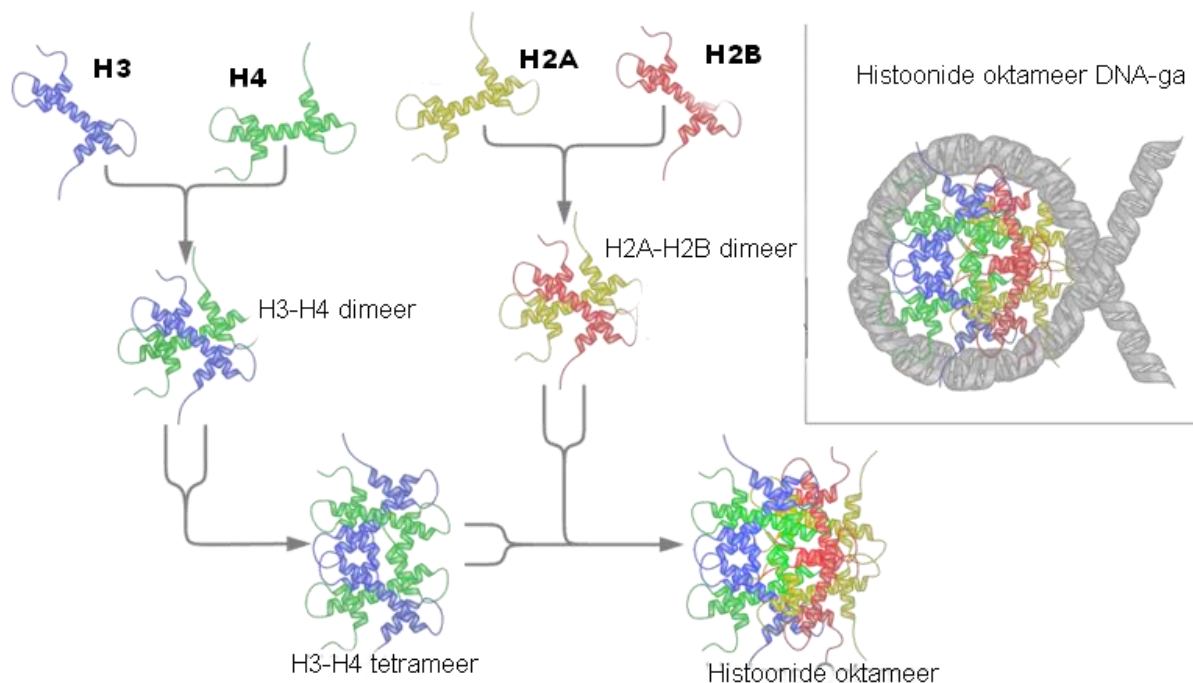
## 1.1. Kromatiini struktuur

Eukarüootses organismis on DNA kokku pakitud stabiilsesse struktuuri mida nimetatakse kromatiiniks. DNA pakkimine kromatiini mängib olulist bioloogilist rolli raku talitluses. Tema struktuur on nii stabiilne kui dünaamiline, kuna erinevad ensüümid võivad muuta valk-valk ja valk-DNA interaktsioone, mis leiavad aset kromatiini struktuuris. Interaktsioonide tugevuse muutmise kaudu on võimalik reguleerida ja kontrollida erinevaid DNA-l toimuvaid protsesse (nt transkriptsioon, replikatsioon, reparatsioon) (Luger jt., 1997).

Eukarüootset kromatiini saab jaotada kaheks: heterokromatiiniks ja eukromatiiniks. Heterokromatiini piirkonnas geenide transkriptsiooni ei toimu või toimub väga harva, sest selles piirkonnas on kromatiin tugevasti kondenseerunud. Eukromatiini piirkonnas on kromatiin decondenseerunud olekus, mistõttu enamus geenide transkriptsioon on aktiivne (Kouzarides, 2007).

Kromatiini fundamentaalsed kordusühikud on nukleosoomid, mis on omavahel ühendatud 10-80 aluspaari pikkuse "linker" DNA-ga, millega seondub histoon H1 (Joonis 1). Histoonid H2A, H2B, H3 ja H4, mis esinevad eukarüootses organismis kahes korduses, moodustavad oktameeri ehk nukleosoomi südamiku. Oktameeri ümber on keerdunud 1.65 korda 147 aluspaari pikkune DNA ahel (Joonis 1). Nukleosoomi roll eukarüootides on DNA pakkimine rakutuumas, mis määrab DNA kättesaadavuse teistele valkudele, näiteks RNA ja DNA polümeraasidele (Luger jt., 1997).

Histoone saab omakorda jagada kaheks funktsionaalseks osaks: histooni "kehaks" ja histooni "sabaks" (C-terminaalne ja N-terminaalne). Histooni "keha" vastutab nukleosoomisest (histoon-histoon ja histoon-DNA) kontaktide eest. Histooni "sabad" ulatuvad nukleosoomist väljapoole ja on sihtmärgiks paljudele post-translatsioonilistele modifikatsioonidele. Enamus modifikatsioone toimuvad N-terminaalsel "sabadel", kuid on olemas ka C-terminaalsed modifikatsioonid (C-terminaalne H2A ja H2B ubikvitineerimine) (Kouzarides 2007).



**Joonis 1. Nukleosoomi struktuur ja moodustumine.** Histoonid H3 ja H4 moodustavad alguses 2 dimeeri, mis ühinevad seejärel tetrameeriks. Histoonid H2A ja H2B moodustavad dimeeri, seonduvad H3-H4 tetrameeriga ja moodustavad oktapeeri ehk nukleosoomi südamiku, mille ümber on keerdunud DNA lõik. Moodustunud struktuur on nukleosoom (Alberts jt., 2001).

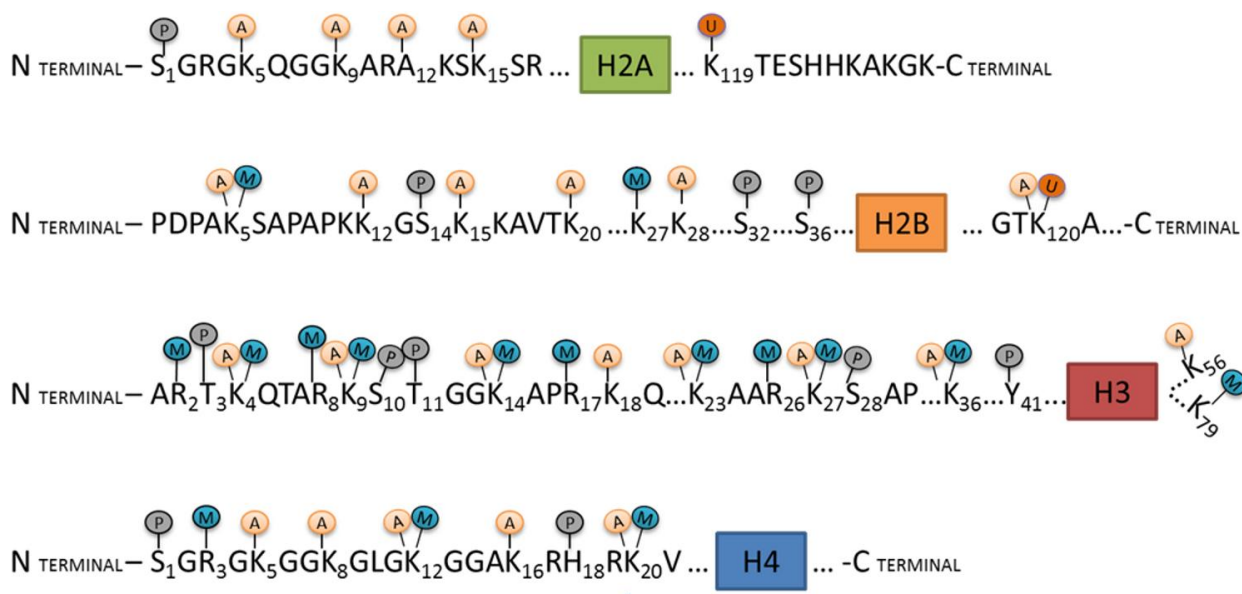
## 1.2. Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

DNA pakkimine kromatiiniks on põhiline mehhanism, millega on blokeeritud juurdepääs DNA-le. Seda barjääri aitavad ületada post-translatsioonilised modifikatsioonid (PTM). Histoonide modifikatsioonid mõjutavad kromatiini kahel viisil: 1) reguleerivad histoonide omavahelisi interaktsioone ja 2) tekitavad seonduvaskohti mittehistoonsetele valkudele (Kouzarides, 2007). Histoonidel on kirjeldatud mitmeid modifikatsioone: lüsiinide (K) atsetüleerimine, ubikvitinüleerimine, sumoüleerimine, ADP ribosüleerimine, lüsiini (K) ja arginiini (R) metüleerimine, seriini (S) ja treoniini (T) fosforüleerimine, arginiini (R) deiminatsioon ja proliini isomerisatsioon (Bannister ja Kouzarides, 2011).

Kõik need modifikatsioonid moodustavad nn. "histooni koodi", mis seisneb selles, et histoonide modifikatsioonide muster määrab kromatiini seisundi: ühed aktiveerivad kromatiini (atsetüleerimine eemaldab positiivse laengu lüsiinjäägist, mis vähendab nukleosoomi afiinsust

negatiivselt laetud DNA-le ja selle tulemusena DNA muutub kättesaadavamaks transkriptsioonifaktoritele), teised aga represseerivad kromatiini muutes selle heterokromatiiniks (Cheung, 2000; Jenuwein ja Allis, 2001).

Kõik PTM on kõrgelt konserveerunud ja toimuvad ainult kindlates kohtades (Joonis 2). Tänu kõrgele spetsiifikale arvatakse, et PTM käituvad signaalina erinevatele valkudele, mis omavad post-translatsioonilise modifikatsioonide äratundvaid domeene (histoonide atsetüültransferaasid – bromodomeen, histoonide metüültransferaasid - kromodomeen) (Cheung jt., 2000).



**Joonis 2. Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.** Pildil on näidatud kõik neli põhi histooni (värvilised ristkülikud) ja modifikatsioonid, mis toimuvad histoonide N- ja C-terminaalsetel "sabadel". Modifikatsioonid on tähistatud vastavalt: atsetüleerimine (A), metüleerimine (M), fosforüleerimine (P) ja ubikvitineerimine (U) (Yong Zhong Xu jt., 2013).

### 1.2.1. Histoonide metüleerimine

Histoonide metüleerimise käigus seostatakse metüülrühm kas arginiinile (üks või kaks metüülrühma) või lüsiinile (kuni kolm metüülrühma). Võrreldes atsetüleerimisega ei kaota lüsiinijääk metüleerimise käigus oma laengut. Kuna laeng jääb samaks, siis histoonide metüleerimine ei mõjuta otseselt kromatiini struktuuri, kuid metüülrühm on seondumissignaaliks valkudele, mis omavad metüülgruppe siduvaid domeene (kromodomeen, PHD domeen, Tudor domeen) (Bedford ja Richard, 2005).

Pagaripärmis on lüsiini metüleerimine tuvastatud vähestes positsioonides: H3K4, H3K36 ja H3K79. Poolduvas pärmis ja kõrgemates eukarüootides metüleeritakse ka H3K9, H3K27 ja H4K20. Võrreldes histoonide atsetültransferaasidega (HAT), on histoonide metüültransferaasid (HMT) kõrge spetsifilisusega, seega erinevates positsioonides metüleerivad lüsiinjääki erinevad ensüümid. Pärmis on need Set1(H3K4), Set2(H3K36) ja Dot1(H3K79) (Fuchs jt., 2008).

Histoonide metüleerimine omab transkriptsioonis erinevaid rolle, mis sõltub metüleerimise astmest ja positsioonidest. Aktiivse transkriptsiooniga seostatakse näiteks H3K4, H3K36 ja H3K79 metüleerimist. Vaigistamisega ja heterokromatiini moodustumisega on seotud H3K9 metüleerimine poolduvas pärmis (Fuchs jt., 2008).

Arginiini metüleerimine toimub H4R3 ja H3R2 positsioonidel ja metüleerimist teostavad arginiini metüültransferaasid (PRMT)(Yu jt., 2006).

### **1.2.2. H3K36 metüleerimine**

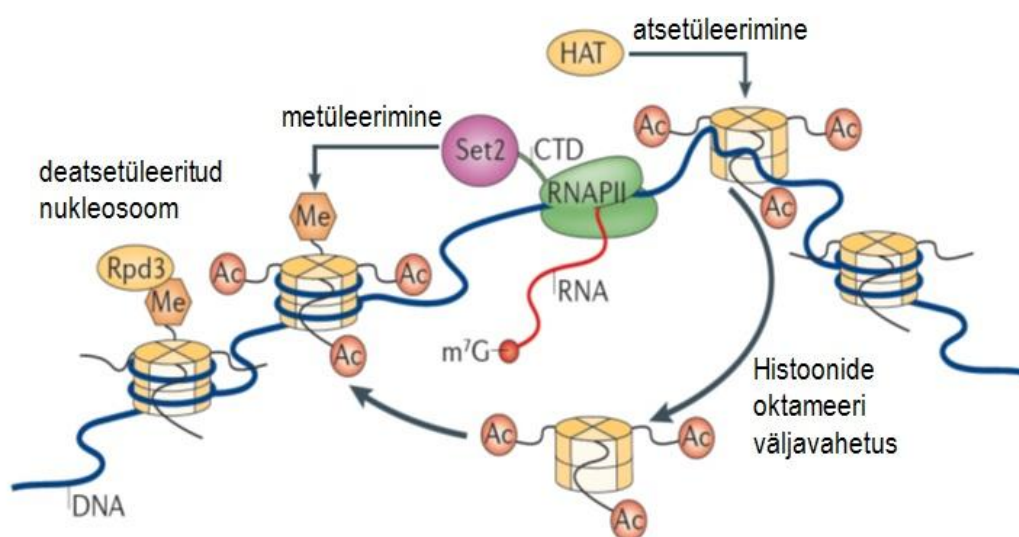
Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) teostab metüültransferaas Set2 kõiki histoon H3 lüsiinjääki 36 metüleerimise astmeid, lisades ühe, kaks või kolm metüülgruppi lüsiinjäägi ε-aminogrupile, kasutades metüülgrupi doonorina S-adenosüülmetsiooni (joonis 3) (Strahl jt., 2002).

H3K36 metüleerimine on pagaripärmis oluline korrektseks transkriptsiooni elongatsiooni toimumiseks. On näidatud, et Set2 deleteerimine põhjustab tundlikust elongatsiooni inhibeerivate kemikaalide nagu 6-azauratsiil (6-AU) suhtes. Lisaks, tüved mis omavad mutatsioone lüsiin 36 metüleerimises omavad samuti suurenenud tundlikust, viidates sellele, et vastav fenotüüp on tingitud Set2 võimetusest H3K36 metüleerida (Kizer jt. 2005).

Ülegenoomsetest kromatiini immuunopretsipitatsiooni uuringutest on selgunud, et H3K36 metüleerimine esineb aktiivselt transkribeeritavatel geenidel, ent dimetüleerimine (H3K36me2) ja trimetüleerimine (H3K36me3) omavad erinevat paiknemise mustrit. H3K36me2 esineb ühtlaselt kogu transkribeeritava geeni ulatuses, teisalt H3K36me3-st on tuvastatud eelkõige geenide kodeerivatel aladel ning viimane omab positiivset korrelatsiooni geeni transkribeerimise määraga (Pokholok jt., 2005).



Lisaks seosele aktiivse transkriptsiooniga omab H3K36 metüleerimine rolli ka geenide negatiivsel regulatsioonil. Lüsiini 36 metüleerimine on oluline ärahoidmaks mittevajalikku geenisest transkriptsiooni initsiatsiooni (joonis 3). See protsess on vahendatud histoonide deatsetülaasi kompleksi Rpd3S poolt. Viimane koosneb kahest subühikust Eaf3 ja Rco1-st, mis omavad vastavalt kromo- ja PHD domeeni. Eaf3 kromodomeen tunneb ära H3K36me<sub>2/3</sub>, millele järgneb histoonide deatsetüleerimine. Deatsetüleerimisel kaotab valk oma positiivse laengu, mille järel muutub nukleosoomi südamiku ning DNA vaheline side tugevdamaks. Kompaktse kromatiini struktuuri taastamine on oluline takistamaks transkriptsiooni initsiatsiooni toimumist geenide kodeerivatel aladelt (Keogh jt., 2005; Carrozza jt., 2005)



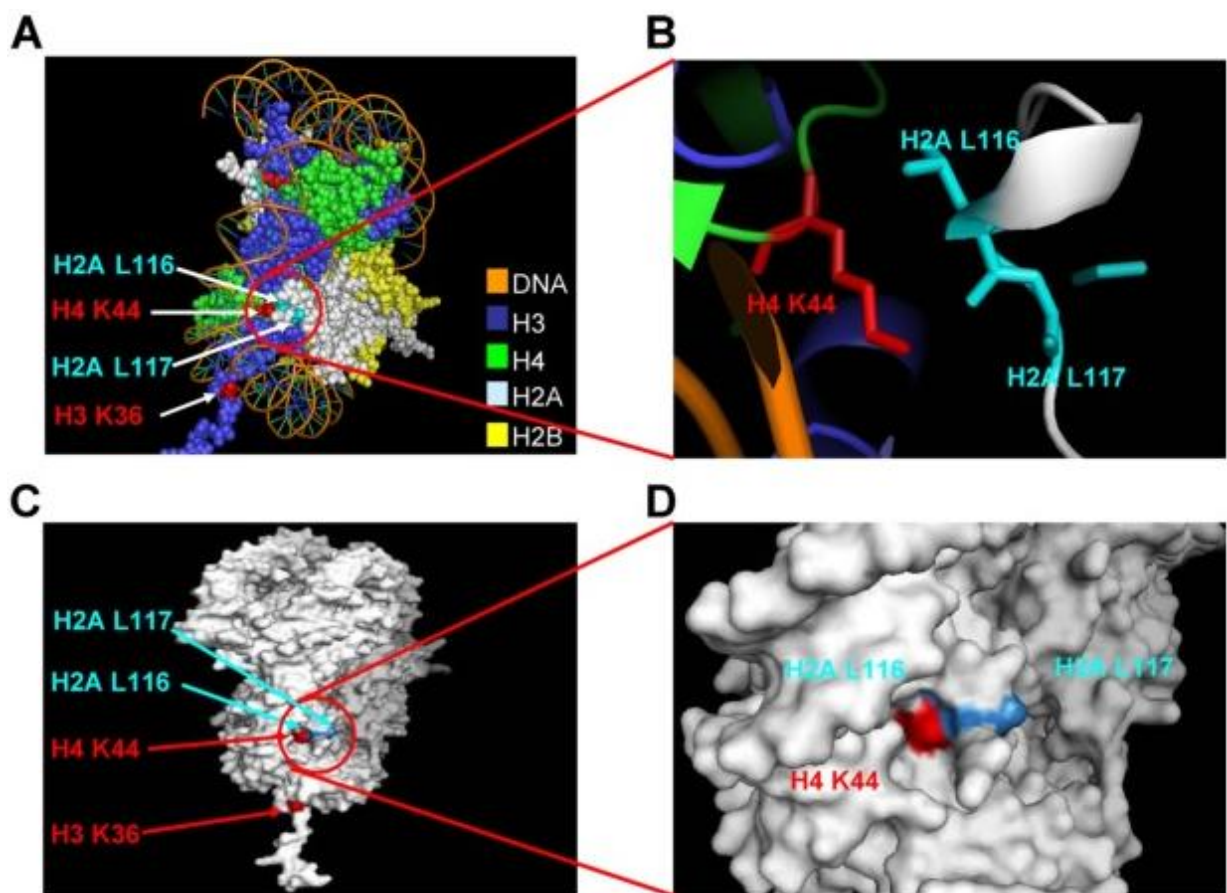
**Joonis 3. H3K36 trimetüleerimise poolt vahendatud transkriptsiooni repressioon kodeerivatel aladel.** Aktiivselt transkribeeriv RNAPII eemaldab enda ees olevaid atsetüleeritud nukleosoomi, mis lülitatakse uuesti kromatiini koosseisu viimase järel. Set2 trimetüleerib H3K36 äsja lisatud nukleosoomides, olles signaaliks Rpd3S deatsetülaasi kompleksile, mis seejärel seondub ja viib läbi nukleosoomide deatsetüleerimise. Selline mehhanism hoiab ära ebakorrekse transkriptsiooni initsiatsiooni esinemise RNAPII transkribeerimise järel. m<sup>7</sup>G-metüülguanosiin (Wagner ja Carpenter, 2012).

### 1.3. Set2 lokalisatsioon rakus ja DNA-l

H3K36 metüülatsiooni levik transkribeeritavatel geenidel esineb osaliselt tänu Set2 otsesele kontaktile RNA polümeraas II C-terminaalse domeeniga (CTD) (Li jt., 2007). Pagaripärmis koosneb CTD 26st heptapeptiidsest kordusest YSPTSPS, milles kõiki seriinijääke on võimalik

fosforüleerida. Set2 tunneb eelistatult ära hüperfosforüleeritud CTD, mille seriinijääk teisel (Ser2) ja viiendal (Ser5) positsioonil on fosforüleeritud (Chapman jt., 2007). Seandumine toimub läbi Set2 C-terminuses asuva nn. SRI (*Set2-Rpb1 interacting*) domeeni (Kizer jt., 2005). Sellega on kooskõlas ka H3K36me3 esinemise korrelatsioon geeni kehas ja 3' otsas esinevate Ser2 või Ser2/Ser5 fosforüleeritud CTD vormidega (Pokholok jt., 2005).

Set2 seandumine RNAPII CTD-ga on esimene etapp H3K36 trimetüleerimise toimumisel. On näidatud, et Set2 poolt vahendatud H3K36 metüleerimisel esineb ka nn. *trans*-histooni rada. Set2 N-terminus interakteerub histooniga H4, mis on vajalik nii lüsiin 36 di- kui trimetüleerimiseks. Selles protsessis on oluline roll histoonis H4 asuval konserveerunud lüsiinijäägil 44 (H4K44) (joonis 4). Eelnev interaktsioon on vajalik ka geenisisese transkriptsiooni initsiatsiooni represseerimiseks. Hiljem on detekteeritud ka H4K44 läheduses asuvate histooni H2A leutsiinijääkide 116 ja 117 vajalikkus K36 metüleerimisel (Du ja Briggs, 2010). Lisaks on avastatud, et histoon H3 saba seostub samuti Set2-ga ja tagab lüsiinijäägi 36 õige positsiooni Set2 aktiivsaidis. Histoon H3 saba deleteerimine või sabas asuvate laetud lüsiinijääkide vahetamisel neutraalsete glutamiinide vastu viib Set2 aktiivsuse vähenemisele (Psathas jt., 2009). On tõenäoline, et mitmed aminohappejäägid histoonidel H3, H4 ja H2A aitavad kaasa ja moodustavad Set2 nn. äratundmise koha nukleosoomil, mis on vajalik korrektseks H3K36me<sub>2/3</sub> ja transkriptsiooni elongatsiooni toimumiseks.



**Joonis 4. Nukleosoomi kristallstruktuur, milles viidatud H4 lüsiin 44 ja H2A leutsiin 116 ja 117 positsioonid.** A) Inimese nukleosoomi struktuur (H3-sinine, H4-roheline, H2A-hall, H2B-kollane). H3K36 ja H4K44 on märgitud punasega ja H2AL116 ja H2AL117 on märgitud sinisega. B) sissevõtte nukleosoomist, viidates H4K44 ja H2AL116 ning H2AL117 üksteisele väga lähedal esinemisele. H3K36 ja H4K44 on märgitud punasega ja H2AL116 ja H2AL117 on märgitud helesinisega. C ja D) H4K44, H2AL116 ja H2AL117 moodustavad justkui “laigu” nukleosoomi pinnale, “tasku” struktuuri sisse või lähedale. H3K36 ja H4K44 on märgitud punasega ja H2AL116 ja H2AL117 on märgitud helesinisega (Du ja Briggs, 2010).

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk oli uurida Set2 rolli RNA polümeraas II sõltuvas transkriptsioonis:

- Teha kindlaks, kuhu lokaliseerub Set2 transkriptsiooni aktiveerimisel mudelgeenil *GAL-VPS13*
- Välja selgitada, kas Set2 suudab iseseisvalt liikuda väljaspoole transkribeeritavat ala, sõltumatult RNA polümeraas II-st.

## 2.2. Materjal ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud söötmed

*Saccharomyces cerevisiae* tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract*, *peptone*, *dextrose*) tard- [agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB MTM*), pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB MTM*)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos või galaktoos 200 g/l (*Applichem*)]. Tardsöötmetel kasvatati pärmirakke 30° C juures, vedelkultuure aereeriti loksutil samal temperatuuril.

Modifikatsiooni sisaldavate tüvede konstrueerimisel kasvatati pärmi transformeerunud rakkude selekteerimiseks -His, -Ura, -Leu, -Lys, -Trp agarsöötmetel [YNB (*Yeast nitrogen base*, *Applichem*) 6,7 g/l, glükoos 2% (*Medipharma*), agar 2% (*LAB MTM*), aminohapped ja nukleotiidid lisati kõik peale vastava miinusmärgiga aminohappe – Adeniin 40 µl/ml, Uratsiil 40 µl/ml, Leutsiin 80 µl/ml, Trüptofaan 40 µl/ml, Lüsiin 80 µl/ml, Histidiin 40 µl/ml (*Serva*)].

### 2.2.2. Kasutatud pärmitüved

Töös kasutati pärmitüvesid AKY153, 208, 369 ja 658, mis on konstrueeritud Arnold Kristjuhani töögrupi poolt ja pärmitüvesid AKY910, 978, 979 ning 1053, mis saadi selle töö raames (Tabel 1). Tüvedes AKY153, 208, 369, 910, 979 ja 1053 on mudelgeeni *VPS13* ees galaktoosiga reguleeritav *GAL10* promootor. Lisaks on AKY208, 979 ja 1053 tüvedes *VPS13* geeni sees promootorist 3 kb kaugusel transkriptsiooni terminaatorpiirkond.

Esmalt konstrueeriti tüve AKY369 baasil tüvi AKY910. Saadud tüvi sisaldab 3F12 epitoopi Set2 C-terminuses ja URA3 markergeeni. Järgmiseks ristati tüvesid AKY910 ja AKY658, millest tetraadanalüüsi meetodil saadi tüvi AKY987. Seda tüve ristati omakorda tüvega AKY208 ning sellest ristamisest saadi tetraadanalüüsi meetodil tüvi AKY979 (Tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatud pärmitüved.

Tüvi	SET2	Genotüüp
W303	Wt	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A <i>ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1 100 lys2</i>
153	Wt	W303, MAT $\alpha$ , <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-101 lys2<math>\Delta</math> can1-100</i>
208	Wt	W303, MAT $\alpha$ , GAL-prom-VPS13-3kb FBA1-term::TRP1, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
369	Wt	MAT A, GAL-pr-VPS13::TRP1, Rpb3-3x1E2::HIS3, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
658	Wt	MAT $\alpha$ , Mcm4-3xMyc::LEU2, <i>bar1::hphMX6, ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
910	3x3F12	MAT A, GAL-pr-VPS13::TRP1, Rpb3-3x1E2::HIS3, Set2-3xF12::URA3, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
978	3x3F12	MAT A, Mcm4-3xMyc::LEU2, Rpb3-3x1E2::HIS3, Set2-3xF12::URA3, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
979	3x3F12	MAT A, GAL-pr-VPS13-3kb-term::TRP1, Mcm4-3xMyc::LEU2, Rpb3-3x1E2::HIS3, Set2-3xF12::URA3, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
1053	Wt	MAT $\alpha$ , GAL-pr-VPS13-3kb-term::TRP1, Rpb3-3x1E2::HIS3, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>

### 2.2.3. Pärmis transformeerimine

Pärmütüve AKY369 kasvatati üleöö 25 ml vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni  $3 \times 10^8$  rakku/ml. Kasvanud rakud tsentrifuugiti 5 min 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), eemaldati sööde ja suspendeeriti 9 ml steriilses TEs (10 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA) + lisati 1 ml 1M LiAc (lõpp kontsentratsioon 0,1M). Rakud pandi veel 45 min, 30°C juures loksuma (100rpm). Pärast seda lisati rakkudele 250  $\mu$ l 1M DTT ((2S,3S)-1,4-bis(sulfany)butane-2,3-diol) ja jäeti veel 15 min samadel tingimustel loksuma. Seejärel lisati rakkudele 40 ml vett ja fuugiti 5 min 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F). Rakke pesti 2 korda 50 ml külma veega (tsentrifuugiti 4°C juures). Pestud rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas 1M sorbitoolis ja kanti üle 1,5 ml *Eppendorf* tuubidesse, fuugiti 1 min 6000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11), suspendeeriti uuesti 1 ml 1M sorbitoolis ja fuugiti veelkord. Seejärel resuspendeeriti rakud 50  $\mu$ l 1M sorbitoolis.

Poreerimine viidi läbi 2 mm küvettides, kuhu lisati 40 µl rakke + 5 µl poreeritavat DNA-d, milleks oli varasemalt 3x3F12-URA plasmiidilt amplifitseeritud lõik. Pärast poreerimist lisati rakkudele kohe 1 ml 1M sorbitooli ja jäeti jääle seisma 30 minutiks. Küvettidest tõsteti rakud *Eppendorf* tuubidesse, tsentrifuugiti 1 min 6000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11), resuspendeeriti 100 µl 1M sorbitoolis ning külvati –URA tassile.

#### **2.2.4. Genoomse DNA eraldamine**

Genoomse DNA saamiseks pärmirakkudest võeti üks pärmikoloonia –URA tassilt ja suspendeeriti 200 µl vees *Eppendorf* tuubis, kuhu lisati 100 µl 200 mM LiOAc, 1% SDS lahust. Rakke inkubeeriti 5 min 70°C juures. Seejärel lisati 600 µl 96% etanooli ja fuugiti 3 min 14000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Sadet pesti 70% etanooliga ning seejärel lahustati DNA sade 100 µl vees. Proove fuugiti 15 sek 14000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ning 1 µl supernatanti kasutati PCR-iks.

#### **2.2.5. Immunosadestamine ja Western-blot (WB)**

Pärmitüvesid AKY 979 ja AKY 1053 kasvatati üleöö 50 ml vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni  $1,7 \cdot 10^7$  rakku/ml, fuugiti 5 min 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F) ja eemaldati sööde. Rakud suspendeeriti 500 µl FA-lüüsipuhvril (koostis LISA1), millele olid lisatud proteaasi inhibiitorid (Protease Inh. Cocktail tablets "Complete", 1 tablett 50 ml lüüsilahuse kohta) ja kanti üle *Eppendorf* tuubidesse. Rakususpensioonile lisati klaaskerakesi [0,5 mm *Glass Beads (Soda Lime) (BioSpec Products Inc.)*] kuni 800 µl-ni. Rakke lõhuti 15 minutit klaaskerakestega 4°C juures, kasutades masinat *Disruptor Genie™ (Scientific Industries)*. Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti nõelaga *Eppendorfi* põhja auk ning asetati 1,5 ml *Eppendorf* tuub 15 ml tuubi sisse. Tsentrifuugiti 3 min 1500 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11) ning saadud lüsaadile lisati 1 ml FA-lüüsipuhvrit. Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – Bioruptor™*) 8 min (8 x 30 sek sonikeerimist, 1 min pausi, 200 W, 0° C juures). Rakulüsaat viidi 1,5 ml *Eppendorf* tuubi, tsentrifuugiti 5 min 4°C juures maksimaalsel kiirusel (13200 rpm;

*Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11). Supernatant viidi uude tuubi ning korraldati tsentrifuugimist 30 min 4°C juures (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11).

Saadud supernatandile lisati 3 µl 5E11 antikeha (alkokontsentratsioon 1 mg/ml) ja inkubeeriti üleöö 4°C juures. Proove tsentrifuugiti 15 min 4°C juures täiskiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11) ning supernatant viidi uude 1,5 ml *Eppendorf* tuubi. Seejärel liasti proovidele 20 µl Proteiin-A kerakesi kerakesi [*ProteinA Sepharose™ Fast Flow* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*)] ja 30 µl puhvrit (BSA+FA-lüüsipuhver) ning inkubeeriti 1,5 h 4°C juures. Eelnevalt oli Proteiin-A kerakesi inkubeeritud 15 minutit BSA-ga [BSA (*Bovine serum albumine*, *BioTop*, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) + FA-lüüsipuhver] 4°C juures, pidevalt aeglaselt segades.

Reaktsioone tsentrifuugiti 15 sekundit täispööratel (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Proove pesti järjestikku 1 ml FA-lüüsipuhvri, FA500 ning TES pesulahusega (iga lahusega 5 min, 4° C juures, aeglaselt segades, koostis LISA1). Proovidele lisati 60µl SDS laadimispuhvrit (0,06 M Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 5% 2-merkaptotetanool, 10% glütserool, 0,002% broomfenoolsinine) ja kuumutati 100 °C juures 10 minutit. Protein-A kerakesed fuugiti põhja (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ja lüsaat viidi üle uude *Eppendorf* tuubi.

Valgud lahutati 8% SDS-polüakrüülamiidgeelis [1/3 geelist kontsentreeriv: 5% akrüülamiid; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% NAPS (naatrium persulfaat), 0,06% TEMED (N,N,N',N' – tetrametüüleetüendiamiin); 2/3 osa geelist lahutav: 8% akrüülamiid, 0,375M Tris-HCl pH8,8; 0,1% SDS; 0,1% NAPS; 0,04% TEMED]. Geeli voolutati ühekordses SDS puhvris (0.125 M Tris, 0.96 M glütsiin, 0.5% SDS).

Peale voolutamist inkubeeriti geeli ja eelnevalt metanoolis märjatud PVDF filtrit (*Millipore Immobilon™*) ülekandepuhvris (48 M Tris, 0.39 M glütsiin, 0.037 % SDS, 20 % metanool). 3 Whatmani paberilõiku immutatati ülekandepuhvris ja asetati pool-kuiva ülekande masinale (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*), nende peale asetati PVDF filter (*Millipore Immobilon™*), filtri peale akrüülamiidgeel ja 3 Whatmani paberilõiku. Valkude ülekande toimus 40 minutit 15V juures (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*).

Peale valkude ülekandmist blokeeriti filtrit 1 tund 5% lõssipulbrilahust sisaldavas PBS-Tween20 (0,05%) lahuses toatemperatuuril. Antikehade seostamine toimus 5% lõssipulbri lahust sisaldavas 0,05% PBS-Tween20-is. Primaarse antikehaga inkubeeriti filtrit üleöö 4°C juures ja pesti 4 korda



6 minutit 0,05% PBS-Tween20-ga. Primaarse antikehana kasutati 5E11 antikeha (lahjendusega 1:10000, algkontsentratsioon 1mg/ml), mis tunneb ära Set2 C-terminuses ekspresseeritavat 3x3F12 epitoopi.

Sekundaarse antikehaga inkubeeriti filtrit 5% lõssipulbrilahuses 1 tund toatemperatuuril ja pesti 4 korda 6 minutit 0,05% PBS-Tween20-ga. Sekundaarse antikehana kasutati HRP-ga konjugeeritud hiire antikehade vastast antikeha (lahjendusega 1:10000).

Peale pesemist töödeldi membraani *MILLIPORE Immobilon Western* reagentidega (*HRP Substrate Luminol* ja *HRP Substrate Peroxide*), mõlemaid võeti 750 µl, segati kokku ja pandi membraanile. Membraani inkubeeriti reagentidega 5 min toatemperatuuril ja signaal detekteeriti masinaga *Biospectrum® Imaging System™* (*Ultra-Violet Products Ltd.*)

## **2.2.6. Kromatiin Immunosadestamine (ChIP)**

### **A. Pärmirakuekstrakti valmistamine**

Pärmitüve AKY979 kasvatati üleöö 200 ml-is glükoosi sisaldavas (180 ml YP, 2% glükoos) vedelsöötmes ja 200 ml-is galaktoosi sisaldavas (180 ml YP, 2% galaktoos) vedelsöötmes. Kui rakukultuurid olid kasvanud tiheduseni  $0.5-1 \times 10^7$  rakku/ml, fikseeriti rakud 1% formaldehüüdiga. Rakkude fikseerimiseks lasti neil seista 15 minutit toatemperatuuril, aeg-ajalt segades. Seejärel lisati 20 ml 2M glütsiini (lõppkontsentratsioon 200mM), lasti seista 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke kaks korda 10 ml 1x PBS-ga (koostis LISA1), tsentrifuugiti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F). Rakud resuspendeeriti 1,5 ml FA-lüüsipuhvril ning viidi *Eppendorf* tuubidesse, tsentrifuugiti 12 sekundit (maksimaalse kiiruse saavutamiseni), eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti 750 µl FA-lüüsipuhvril. Rakususpensioonile lisati klaaskerakesi [0,5 mm *Glass Beads (Soda Lime)* (*BioSpec Products Inc.*)]. Rakke lõhuti 15 minutit klaaskerakestega 4°C juures, kasutades masinat *Disruptor Genie™* (*Scientific Industries*). Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti nõelaga *Eppendorfi* põhja auk ning asetati 1,5 ml *Eppendorf* tuub 15 ml tuubi sisse. Tsentrifugiti 3 min 1500 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11) ning saadud lüsaadile lisati 750 µl FA-lüüsipuhvrit. Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – Bioruptor™*) 8 min järjest (6 x 30 sek sonikeerimist, 1 min pausi, 200 W, 0° C

juures). Rakulüsaat viidi 1,5 ml *Eppendorf* tuubi, tsentrifuugiti 5 min 4° C juures maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11). Supernatant viidi uude tuubi ning korrati tsentrifuugimist 30 min 4° C juures (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11). Saadud supernatant on nii rakkude tuumade kui tsütoplasma ekstrakt (*whole cell extract*, WCE).

## **B. Immunopretsipitatsioon (IP)**

Immunopretsipitatsioonil kasutati 5E11 antikeha (lisati IP kohta 1µl, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära Set2 C-terminuses 3F12 epitoopi. Tüves AKY979 on Set2-l 3x3F12 epitop. 300 µl WCE inkubeeriti antikeha ja 300 µl FA-lüüsipuhvriga üleöö 4°C juures. IP proove tsentrifuugiti 15 min 4°C juures täiskiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11) ning supernatant viidi uude 1,5 ml *Eppendorf* tuubi. Proteiin-A kerakesi [*ProteinA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB)*] inkubeeriti 15 minutit BSA-ga [BSA (*Bovine serum albumine*, *BioTop*, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) + FA-lüüsipuhver] 4°C juures, pidevalt aeglaselt segades. 15 µl proteiin-A kerakesi ja 30 µl puhvrit (BSA+FA-lüüsipuhver) lisati IP proovile ning inkubeeriti 1,5 h 4° C juures. IP reaktsioone tsentrifuugiti 15 sekundit täispöörel (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Proove pesti järjestikku 1 ml FA-lüüsipuhvriga (2x), FA500 ning TES pesulahusega (iga lahusega 5 min, 4° C juures, aeglaselt segades). Seondunud valk-DNA kompleksid elueeriti 100 µl eluatsioonipuhvriga (koostis LISA1) toatemperatuuril 10 min, segati aegajalt vortexil. Elueerimise etappi korrati. Proove tsentrifuugiti 1 min täispööretel (13200 rpm, *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11) ning supernatant koguti. Lisati 200 µl H<sub>2</sub>O ning 1 µl Proteinaas K-d (algkontsentratsiooniga 18,7 mg/ml, *Fermentas*) ning inkubeeriti 65° C juures 3 h. DNA eraldati fenool-kloroformi töötlusel. Proovile lisati 400 µl fenool-kloroformi (1:1), segati vortexil ning tsentrifuugiti 5 min maksimaalsetel pööretel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Saadud vesifaasile lisati 400 µl veega küllastatud kloroformi. Segati vortexil ja tsentrifuugiti 5 min 13200 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Vesifaas viidi 2 ml *Eppendorf* tuubi ning lisati 40 µl NaOAc (1:10, algkontsentratsioon 3 M), 1 µl glükogeeni (algkontsentratsioon 20 mg/ml) ja 1,2 ml 96% EtOH (3:1). Proovid pandi sadenema -80°C juurde (minimaalselt 20 min). Proove tsentrifuugiti 4°C juures 15 min (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11). DNA pesti 1 ml 70% EtOH-ga ning

tsentrifuugiti uuesti 4°C juures 5 min (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11). DNA lahustati 200 µl-s H<sub>2</sub>O-s. qPCR-il (*quantitative PCR*) kasutati 5 µl DNA-d.

### 2.2.7. Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kromatiin immunopretsipitatsioonil eraldatud DNA-d analüüsiti qPCR-il, kasutades DNA-ga seonduvat fluorestseeruvat *SYBR Green*® värvi. qPCR analüüs viidi läbi 10,25 µl-s [DNA 5 µl; qPCR-i segu segu (2x, *Maxima SYBR Green ROX*® *qPCR Master Mix*, *Solis BioDyne*) 5 µl; praimerid 0,25 µl (10 pmol/µl)]. Iga praimeritepaariga analüüsiti igat proovi 3-s erinevas kannus. qPCR-il kasutatud praimerite järjestused on näidatud tabelis 2.

qPCR-ks kasutati *Roche Lightcycler 480* masinat. PCR tsükkel oli järgmine: 1. etapp – 95°C 15 minutit (ensüümi aktivatsioon), 2. etapp – 95°C 15 sekundit (denaturatsioon), 60°C 1 minut (praimerite seondumine ja elongatsioon). Tsüklit korrati 40 korda (alates 2. etapist). 3. Etapp (dissotsiatsioon) – 95° C 15 sekundit, 60° C 15 sekundit, 95° C 15 sekundit. qPCR-i tulemuste analüüsimiseks kasutati arvutiprogrammi *Microsoft Excel*.

Tabel 2. qPCR-il kasutatud oligonukleotiidid.

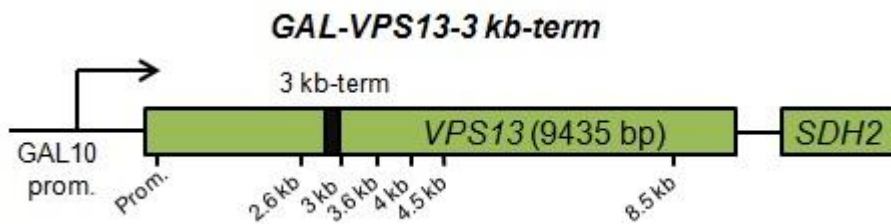
<b>Seondumispäirakond</b>		<b>Järjestus (5' - 3')</b>	
<b>VPS13 geenil</b>			
Prom.		F	GCTAAACCGATTGCTAGGCTCATA R ATCCCTGATTTACATCTATGGGTA
2.6 k		F	ACGTTAATTACTCTTCTGGTTCCGA R AGAATGCTATTTTCGCCTGATCGAT
3 k		F	ATGAAAATTAAAATGGAGGCCGTCA R GATAGAACTAACGTTGCCAGCTTT
3.6 k		F	GTACAACCAAGCCCCTTCCAT R ACTCACCCAAATAAAACCGCAT
4 k		F	TGAATCAGGAGGAAAAGGCGA R AAGTGACGCCCTTTGTCTTGTTA
4.5 k		F	TGGCAATGGACTATTTGGTTTCT R ATCACCATCTTCTTGAAGCTT
8.5 k		F	TGAGAGACACTATACGACCCAGT R TTCTTGAGGCCTATCATTCATCATGT
<b>SDH2 detekteerimiseks kasutatud oligonukleotiid</b>			
SDH2		F	TCAAGATCTATCCATTACCCACAT R TTCAATACTTTGTAGCACTTCCGTT
<b>Normaliseerimiseks kasutatud oligonukleotiid</b>			
Tel 6		F	TAACAAGCGGCTGGACTACTTTC R GATAACTCTGAACTGTGCATCCACTC

## 2.3 Tulemused

Varasemad uuringud näitavad, et H3K36me3 osakaal on nihutatud geeni transkribeeriva ala 3' otsale (Krogan jt., 2003). Selle kinnitamiseks tehti pärmitüved, kus Set2-le on lisatud 3F12 epitoop ja mis sisaldavad galaktoosiga reguleeritavat *VPS13* geeni. Kuna meie töögrupis on varasemalt näidatud, et histoon H3K36 trimetüleerimine on detekteeritav isegi pärast transkriptsiooni termineerimist, siis vaatasime kas Set2 suudab peale transkriptsiooni terminatsiooni ilma polümeraasi abita metüleerida histooni H3.

### 2.3.2 Mudelsüsteemi kirjeldus

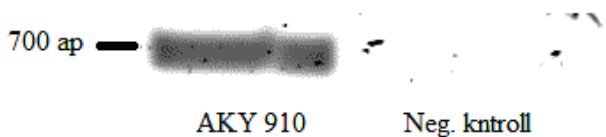
Set2 uurimiseks kasutati mudelorganismina pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*). *S. cerevisiae* on eukarüootne organism, mille geneetiline taust on hästi defineeritud ja mida on võimalik lihtsalt ja kiiresti kasvatada, mistõttu on ta hea mudelorganism bioloogiliste protsesside uurimiseks. Kuna enamus geene pagaripärmis on lühikesed (keskmiselt 1,5 kb) või vajalikud elutegevusele, ei sobi nad kromatiini modifikatsioonide uurimiseks. Seetõttu kasutati pikka mudelgeeni *VPS13* (9,4 kb) (Joonis 5), mille poolt kodeeritud valgu täpne funktsioon pole teada, kuid see ei ole hädavajalik rakkude eluks. *VPS13* on hea mudelgeen kromatiini modifikatsioonide uurimiseks, kuna lähedalasuvate geenide poolt põhjustatud kromatiini modifikatsioonid jäävad uuritavast lookusest piisavalt kaugemale. Katses kasutatud pärmitüvedes on *VPS13* geeni ees tugev *GAL10* promootor, mis võimaldab galaktoosi lisamisel söötmesse indutseerida selle geeni transkriptsiooni. Töös kasutatud tüvi AKY979 sisaldab nii *GAL10* promootorit kui ka 3 kb piirkonnas asuvat tugevat *FBA1* geeni terminaatorjärjestust, mis tähendab, et RNA polümeraas ei ole võimeline vastavat regiooni läbima (Värv jt., 2007).



**Joonis 5. Geenide *GAL-VPS13* ja *SDH2* skemaatiline joonis.** Joonisel on näidatud mudelgeen *GAL-VPS13* ja sellele järgnev *SDH2* geen kromosoomis XII. *GAL-VPS13* geeni ees on galaktoosiga indutseeritav *GAL10* promootor. Musta ribaga on märgitud *FBA1* geeni terminaatorjärjestus geeni 3 kb regioonis. Geeni all on vertikaalsete joontega kujutatud qPCR-il kasutatud *GAL-VPS13* spetsiifilised praimerid (promootorala, 2,6 kb, 3 kb, 3,6 kb, 4 kb, 4,5 kb ja 8,5 kb).

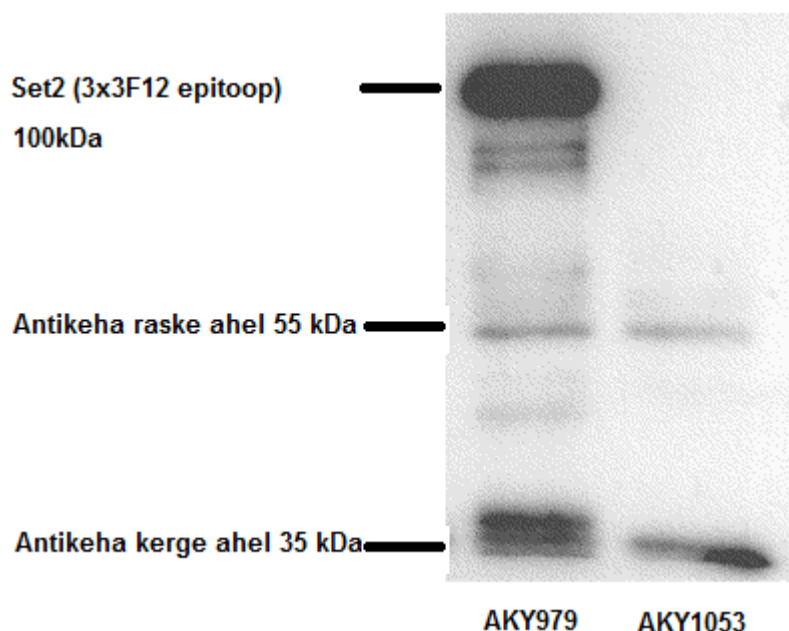
### 2.3.3 Set2-e märgistamine 3x3F12 epitoobiga

Uurimaks Set2 lokalisatsiooni transkribeeritaval *VPS13* geenil, lisasime Set2 valgu C-terminusse 3F12 epitoobi, mis on vajalik immuunosadestamiseks. Selleks amplifitseerisin plasmiidilt 3x-3F12-URA DNA fragmendi, mis sisaldas URA3 markergeeni ning 3x3F12 epitoopi kodeerivat järjestust koos SET2 lookustega homoloogsete DNA järjestustega. Saadud PCR produkt transformeeriti pärmütüvesse AKY369 ning rakud külvati –URA tassile. Moodustunud kolooniad olid võimelised sünteesima uratsiili, mis tähendas, et URA3 geen oli integreeritud nende genoomi. Eraldasid saadud kolooniatest genoomse DNA ja kontrollisin PCR abil, et 3x3F12 epitoobi järjestus on integreerunud SET2 lookusesse (joonis 6).



**Joonis 6. 3x3F12 epitoobi kontroll PCR-il.** Esimesel rajal on uuritav tüvi (AKY910) ja teisel negatiivne kontroll. Uuritavas tüves on detekteeritud positiivne signaal, et 3x3F12 epitoobi järjestus on integreerunud SET2 lookusesse (700 ap).

3x3F12 tagiga märgistatud Set2 valgu ekspressiooni kontrollisin immuunosadestamise ja *western blot*-iga. Selleks kasvasin üleöö 50 ml YPD vedelsöötmes tüvesid AKY979 ja AKY1053 ning valmistasin neist lüsaadi. Tüves AKY979 on 3 kb peal terminaatorjärjestus ja Set2 C-terminuses 3F12 epitoop, mida tunneb ära 5E11 antikeha. AKY1053 on negatiivne kontrolltüvi, kus ei ole 3F12 tagi. Joonisel 7 on näha, et tüve AKY979 ekspresseeritakse 3F12 epitoobiga Set2 valku.

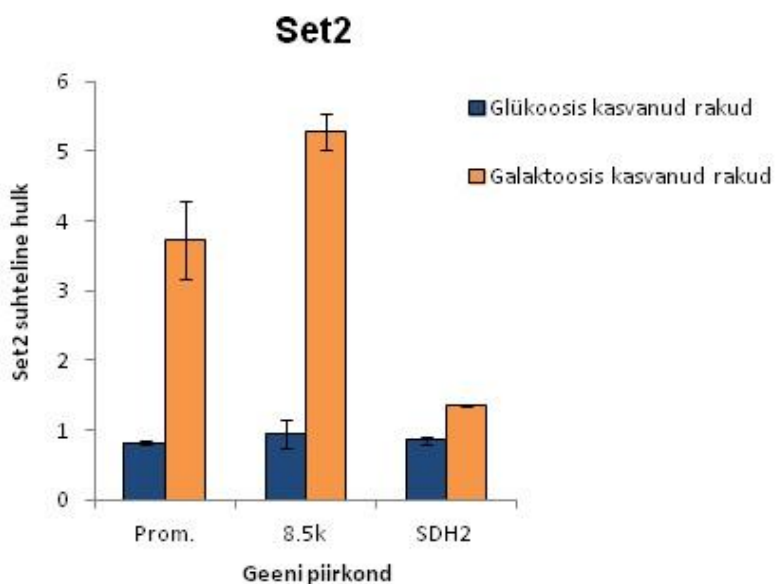


Joonis 7. **Set2 C-terminuses oleva 3F12 epitoobi kontroll immuunosadestamise ja *western-blot* meetodiga.** Esimene rada on uuritud tüvi (AKY979), teine rada negatiivne kontroll (AKY1053). C-terminaalse epitoobi detekteerimiseks kasutati primaarse antikehana 5E11 lahjendusega 1:10000. Signaali detekteerimiseks kasutati masinat *Biospectrum® Imaging System™*

### 2.3.4 Set2 levik VPS13 geenil

Järgnevalt sooviti detekteerida Set2 valku transkriptsiooniliselt aktiveeritud *GAL-VPS13* lookuses. Selleks kasvatati pärmitüve AKY910 nii glükoosi (2%) kui galaktoosiga (2%) söötmes. Pärast üleöö kasvamist kontsentratsioonile  $1 \times 10^7$ , rakud koguti ja nendest valmistati lüsaat, mida kasutati kromatiini immunopretsipitatsioonil (ChIP). ChIP tulemusena saadud DNA kvantiteeriti qPCR meetodil. qPCR-il kasutati praimereid, mis vastasid uuritavatele aladele

*VPS13* geenil, samuti *SDH2* geenile spetsiifilisi praimereid (*SDH2* geen asub genoomis *VPS13* geeni järel, joonis 5). Tulemuste normaliseerimiseks kasutasin Tel6 praimereid (VI kromosoomi parema õla telomeerne piirkond ja mittetranskribeeritav ala). Tulemuse analüüsimisel selgus, et Set2 on detekteeritav *VPS13* geeni transkribeerivas alas (Joonis 8). *SDH2* praimereid kasutati selleks, et vaadata kas Set2 suudab levida transkribeeritavast geenilookusest väljapoole ja potentsiaalselt mõjutada naabergeeni modifikatsioonimustrit. *SDH2* lookuses Set2-de ei detekteeritud, mis näitab, et ta ei levi naabruses olevale geenile.



**Joonis 8. Set2 levik *GAL-VPS13* geenil.** Tüved kasvatati üleöö glükoosis ja galaktoosis. Kõigi kogutud proovidega tehti immuunopretsipitatsioon (ChIP) 5E11 antikehaga ning saadud DNA analüüsiti qPCRil nii *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega (alg, 3,5kb, 5,5kb, 8,5kb) ja *SDH2* praimeritega. Tulemused on normaliseeritud Tel6-ga. Veapiirideks on standardviga.

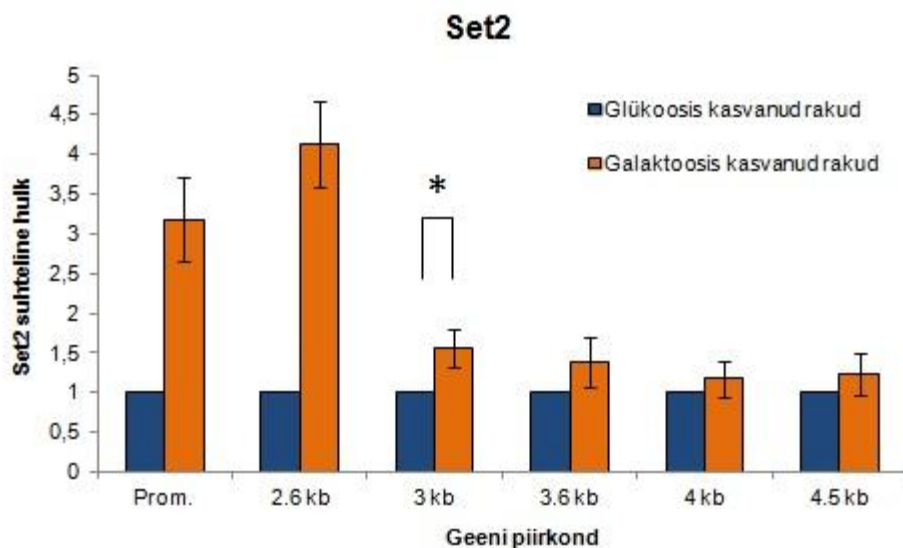
### 2.3.5 Set2 levik transkribeeritavas geenis

Set2 leviku detailsemaks uurimiseks otsustati järgnevates katsetes kasutada tüve AKY979, kus *VPS13* geeni 3 kb peale on viidud tugev transkriptsiooni terminaatorpiirkond. Set2 leviku detekteerimiseks kasvatati tüvesid AKY979 glükoosis ja galaktoosis kuni tiheduseni  $0,5-1 \times 10^7$ . Kogutud rakkudest valmistati WCE (*whole cell extract*), mida kasutati kromatiini



immunopretsipitatsiooniks. Sadestatud DNA analüüsiti qPCR meetodil *VPS13* spetsiifiliste praimeritega (alg, 2.6kb, 3kb, 3.6kb, 4kb, 4.5kb) ning resultaat normaliseeriti Tel6-ga.

Saadud tulemused näitavad, et jõudes terminaatorpiirkonda, Set2 hulk langeb märgatavalt, viidates sellele, et Set2 lokalisatsioon kromatiinil sõltub polümeraasi olemasolust (Joonis 9). Võrreldes glükoosis kasvanud rakkudega, kus *GAL-VPS13* transkriptsiooni ei toimu, võime näha, et 3 kb piirkonnas (3 kb praimerid asuvad kohe pärast terminaatorpiirkonda) on Set2 hulk 1/3 vähem kui galaktoosis kasvanud rakkudes (Joonis 9). Set2 olemasolu selles piirkonnas võib olla seotud sellega, et polümeraas jõudes terminaatorini ei lahku kohe DNA-lt, vaid püsib seal teatud aja. Samuti võib Set2 seonduda histoonidega, mis stabiliseerivad tema seostumist terminaatorpiirkonnaga.



**Joonis 9. Set2 levik *GAL-VPS13-3kb term* geenil.** Pildil on näidatud Set2 levik pärmitüves AKY979. Tüvi kasvatati üleöö glükoosis ja galaktoosis. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immunopretsipitatsioon (ChIP) 5E11 antikehaga ning saadud DNA analüüsiti qPCRil *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega (alg, 2.6 kb, 3 kb, 3.6 kb, 4 kb, 4.5 kb) Tulemused normaliseeriti Tel6 praimeritega. \* $p < 0,05$ , võrreldes glükoosis kasvanud rakkudega. Veapiirideks on standardviga.

## 2.4 Arutelu

Histoonide metüleerimine on oluline epigeneetiline protsess. Võrreldes dünaamiliste modifikatsioonidega, mis on tavaliselt seotud geeni aktiveerimisega ja pärast transkriptsiooni kaovad (atsetüleerimine või fosforüleerimine), on metüleerimine stabiilsem ja säilitatakse geenides pikka aega. Näiteks H3K9 ja K27 on rakkude jagunemisel pärandatavad modifikatsioonimärgid, mis on seotud heterokromatiini moodustumisega (Cheung jt., 2000). Samuti on näidatud, et H3K4me3 säilib geeni promootoralas umbes 5 h pärast transkribeerimise repressioonist (Ng jt., 2003). Metüleerimise stabiilsus seisneb selles, et metüülrühm on neutraalne ja tema lisamine histooni "sabale" ei muuda kromatiini struktuuri otseselt, vaid on signaaliks teiste valkude seondumiseks (Cheung ja Lau, 2005).

On näidatud, et metüleerimine ei ole seotud ainult geeni vaigistamisega, vaid osaleb ka geeni aktivatsioonis ja transkriptsiooni kontrollis (Fuchs jt., 2005). Üks selline näide on H3K36 metüleerimine, mida teostab Set2. H3K36 trimetüleerimine on seondumissignaaliks Rpd3 histooni deatsetülaasi kompleksile, mis tagab histoonide deatsetüleerimise geenide kodeerivatel aladel. Histoonide atsetüleerimistaseme kontrollimine on väga tähtis geenide regulatsioonis, kuna histoonide kõrge atsetüleerituse tase geeni kodeerivas alas võib põhjustada transkriptsiooni initsiatsiooni valedest kohtadest (Swaminathan jt., 2012). Seetõttu uurisime Set2 levikut geeni kodeerivas alas ja transkriptsiooni terminaatori piirkonnas. Varasemad uuringud näitasid, et Set2 levib kotranskriptsiooniliselt seostudes RNA polümeraasi hüperfosforüleeritud CTD-ga. (Krogan jt., 2003). Meie tulemused näitasid, et Set2 esineb terve transkribeeritava geeni ulatuses, kuid ei levi naabergeenile. See viitab sellele, et Set2 ei suuda kromatiiniga seonduda ilma polümeraasi abita. Järgnevalt vaatasime kuidas Set2 levib transkribeeritavas geenis, mille sisse on viidud transkriptsiooni terminaatorjärjestus. Leidsime, et Set2 esineb terminaatorpiirkonna läheduses, kuid edasi ei levi (joonis 9). Viimane tulemus võib olla seotud sellega, et RNA polümeraas ja transkriptsioonikompleks ei lahku kohe terminaatorjärjestusele jõudmisel, vaid seisab seal ja lahkub peale terminatsioonikompleksi tekkimist, mis võtab aega (Richard ja Manley, 2009). Varem on näidatud, et Set2 omab kontakte histoonidega H3, H2A ja H4. On võimalik, et Set2 ensüümid, mis olid tänu polümeraasile geenile toodud, suudavad iseseisvalt seonduda histoonidega ning jäävad seetõttu lookusesse püsima. Lisaks, on näidatud, et H4K44 aminohappejääk, mis on oluline H3K36 metüleerimiseks ja Set2 seondumiseks histooniga, on rohkem kättesaadav kui H2A-H2B dimeer on nukleosoomist eemaldataud (Du jt., 2008), mis

võib olla üheks põhjuseks, miks Set2 ei levi transkribeeritavast alast väljapoole, sest seal on nukleosoomid terved.

Set2 võimetusel seostuda mittetranskribeerivate geenidega võib olla oluline bioloogiline roll. Kuna Set2 poolt teostatud H3K36 trimetüleerimine on seondumissignaaliks Rpd3 histooni deatsetülaasile, siis Set2 seondumine mittetranskribeeritava geeniga võib viia selles piirkonnas histoonide deatsetüleerimiseni, mis omakorda võib saada takistuseks transkriptsiooni initseerimisel.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös vaadati kuidas levib Set2 mudelgeeni *GAL-VPS13* lookuses ning kas Set2 levib ka väljaspoole transkribeeritavat ala.

Töö tulemused on järgmised:

- Set2 levib kogu *GAL-VPS13* geeni ulatuses.
- Set2 esineb terminaatorpiirkonnas, kuid peale seda tema signaal kaob.

# **The role of methyltransferase Set2 in transcription elongation in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**

Roman Sõtšov

## **SUMMARY**

DNA in eukaryotic organisms like yeasts is packed into a structure called chromatin. DNA in this state is highly condense and able to fit into the nucleus. To reach this condition, DNA is wrapped around histones, which are evolutionarily conserved eukaryotic proteins. On the N-terminal "tails" of these proteins there are specific places which can be modified by different non-histone proteins, such as histone acetyltransferases and methyltransferases. These modifications play a significant role in gene regulation, while some of them are associated with activate gene transcription, others are repressive for RNAPII and transcription complex.

Histone methyltransferases add methyl groups to either histone H3 or H4. Histone methylation has no direct effect on the chromatin structure, but poses as a signal for many other proteins. Signal strength depends on the methylation state, while mono- and dimethylation is generally not enough to recruit any enzymes, trimethylation is mostly the place where proteins bind.

In this study we observed the distribution of Set2 methyltransferase in budding yeast. For this, Set2 was tagged with 3x3F12 epitope. Also, we have a *GAL10* promoter in front of our model gene *GAL-VPS13*, so we can induce transcription of the gene by adding galactose to the medium. By detecting Set2 localization on the gene, we confirmed previous reports indicating that Set2 spreads co-transcriptionally with the polymerase and is present in the transcribed region with a greater proportion on the 3' end of the gene. The second experiment was performed by inserting a strong terminator site into the 3 kb region of the gene. This was done to see weather Set2 is able to spread on the gene without the polymerase and continue to methylate H3K36. As a result we observed a slight increase in Set2 levels at the terminator region in galactose grown cells compared with non-transcribed glucose grown cells. After the terminator region there was no

difference between the Set2 amount in the transcribed and non-transcribed genes, meaning that the polymerase plays a crucial role in the Set2 methyltransferase recruitment.

## KIRJANDUSE LOETELU

Alberts jt. (2001). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science

Bannister, A. J. and Kouzarides, T., (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21: 381-395

Bedford MT, Richard, S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function *Mol Cell* 18: 263–272.

Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., Workman, J.L. (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123: 581–592

Chapman, R. D., M. Heidemann, T. K. Albert, R. Mailhammer, A. Flatley, M. Meisterernst, E. Kremmer ja D. Eick (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318(5857): 1780-1782.

Cheung, P., Allis, C. D. ja Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103: 263–271

Cheung, P., ja Lau, P., (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants *Molecular Endocrinology* 19: 563-573

Du, H. N. ja S. D. Briggs (2010) A nucleosome surface formed by histone H4, H2A, and H3 residues is needed for proper histone H3 Lys36 methylation, histone acetylation, and repression of cryptic transcription. *J Biol Chem* 285(15): 11704-11713.

Fuchs, M. S., Laribee, N. R., Strahl, D. B (2008). Protein modifications in transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta* 1789: 6-36

Jenuwein, T. ja Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080

Keogh, M.C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J.S., Hughes, T.R., Strahl, B.D., Grunstein, M., Greenblatt, J.F., Buratowski, S., Krogan, N.J. (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123: 593–605.

Kizer, K. O., H. P. Phatnani, Y. Shibata, H. Hall, A. L. Greenleaf ja B. D. Strahl (2005). A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* 25(8): 3305-3316.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705.

- Krogan NJ, Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, DP., Beattie, BK., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S., Greenblatt, J. (2003) Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 23(12):4207-18.
- Li, B., M. Gogol, M. Carey, D. Lee, C. Seidel ja J. L. Workman (2007). Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. *Science* 316(5827): 1050-1054.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-60.
- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell.* 11(3):709-19.
- Patricia R. ja James L. M. (2009) Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev* 23(11): 1247-1269
- Pokholok, D. K., C. T. Harbison, S. Levine, M. Cole, N. M. Hannett, T. I. Lee, G. W. Bell, K. Walker, P. A. Rolfe, E. Herbolsheimer, J. Zeitlinger, F. Lewitter, D. K. Gifford ja R. A. Young (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4): 517-527.
- Psathas, J. N., S. Zheng, S. Tan ja J. C. Reese (2009). Set2-dependent K36 methylation is regulated by novel intratail interactions within H3. *Mol Cell Biol* 29(24): 6413-6426.
- Saunders, A., Core, J. L. ja Lis, T. J. (2006). Breaking barriers to transcription elongation" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 557-567
- Strahl, B. D., P. A. Grant, S. D. Briggs, Z. W. Sun, J. R. Bone, J. A. Caldwell, S. Mollah, R. G. Cook, J. Shabanowitz, D. F. Hunt ja C. D. Allis (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 22(5): 1298-1306.
- Swaminathan. V., Michaela, S, Hua Li. Madelaine, M. G., Malika S., Shambhu, K., Krishnamurthy, N. ja Jerry, L. W. (2012) *Nature* 489: 452-455
- Värv, S., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. (2007). RNA polymerase II determines the area of nucleosome loss in transcribed gene loci. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 666-671
- Wagner, E. J. ja P. B. Carpenter (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2): 115-126.
- Yong Zhong Xu, Cynthia Kanagaratham ja Danuta Radzioch (2013). *Chromatin Remodelling During Host-Bacterial Pathogen Interaction, Chromatin Remodelling.* ISBN: 978-953-51-1087-3



Yu MC, Lamming DW, Eskin JA, Sinclair DA, Silver PA. (2006) The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev.* 20: 3249–3254.

## LISA 1

### Kromatiin immunopretsipitatsiooni puhvrid:

#### PBS (10x, pH 7,4) 1000 ml

2 g KCl

80 g NaCl

17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### FA-lüüsipuhver

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoolhape

Proteaaside inhibiitorite segu [1 mM PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*), 1 µg/ml leupeptiin, 1 µg/ml pepstatiin)

#### FA500

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoolhape

### TES

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

100 mM NaCl

### Elueerimispuhver

100 mM tris pH 7,8

10 mM EDTA

1% SDS

400 mM NaCl

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Roman Sõtšov

sünnikuupäev: 26.04.1991

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Metüültransferaas Set2 roll transkriptsiooni elongatsioonil pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

mille juhendajad on Arnold Kristjuhan ja Henel Sein

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **1.06.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014